

УДК 576.895.121 : 598.412

ЦИТОМОРФОЛОГИЯ ЗРЕЛЫХ ЯИЦ ЦЕСТОДЫ FIMBRIARIA FASCIOLARIS (CESTOIDEA, HYMENOLEPIDIDAE)

В. А. Кашин, Л. Т. Плужников

Институт биологических проблем Севера ДВНЦ АН СССР, Магадан

Изучена ультраструктура зрелых яиц цестоды *F. fasciolaris*. На основании цитоморфологических различий определено три типа железистых образований в онкосфере. Обсуждается их функциональное значение.

Ультраструктуре онкосфер и зародышевых оболочек яиц циклофиллидей посвящено небольшое количество работ, выполненных в основном на «лабораторных» видах рода *Hymenolepis* (Collin, 1968, 1969; Pence, 1970; Rybicka, 1972, 1973; Lethbridge, Gijbsberg, 1974; Furukawa e. a., 1977).

В связи со слабой изученностью онкосфер циклофиллидей до сих пор нет единого мнения о генезисе зародышевого тегумента, функциональной значимости различных типов секреторных клеток. Например, «железам проникновения» приписывается роль цистогенных элементов (Краснощеков, Томиловская, 1978), тогда как другие авторы рассматривают их секрет как материал литической или иммуногенной природы (Lethbridge, 1980).

Нами было предпринято изучение ультраструктуры зрелых яиц цестоды *Fimbriaria fasciolaris* (Pallas, 1781) — обычного паразита утиных птиц. Выбор объекта был продиктован несколькими обстоятельствами. Во-первых, личинка данного вида представляет собой особый тип — циклоцерк, характеризующийся наличием наружной бесклеточной оболочки, генезис которой неясен. Во-вторых, в литературе отсутствуют сведения об ультраструктуре яиц гименолепидид, промежуточными хозяевами которых являются водные беспозвоночные.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ

Исследование проводили на содержащих зрелые яйца маточных члениках цестод *F. fasciolaris* из шилохвосты *Anas acuta*. Зрелость онкосфер определяли по их подвижности при наблюдении в световом микроскопе выделенных в воду яиц.

Для световой микроскопии маточные членики, содержащие зрелые яйца, фиксировали в жидкости Буэна, обезвоживали и заливали в парафин. Серийные срезы толщиной 7—10 мкм окрашивали альтиановым синим-ШИК по методу Моури (Лилли, 1969) с последующей докраской ядер гематоксилином по Эрлиху.

Для электронной микроскопии маточные членики *F. fasciolaris* фиксировали в 6.5%-ном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере pH=7.4. После промывания в растворе сахарозы членики рассекали на мелкие кусочки и дополнительно фиксировали в течение 2 ч. в 2%-ном растворе OsO₄ на ацетат-вероналовом буфере по Колфилду. Материал обезвоживали в спиртах нарастающей концентрации и заливали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультратоме ЛКВ, окрашивали уранилацетатом и контрастировали свинцом по Рейнольдсу. Материал исследовали в электронном микроскопе Tesla BS-500 при ускоряющем напряжении 90 кв.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Зрелое яйцо *F. fasciolaris* представляет собой типичный 6-крючный зародыш — онкосферу, 32×40 мкм, окруженную зародышевыми оболочками, имеющими сложную организацию (рис. 1, 1; см. вкл.). При попадании яиц в воду их наружная оболочка расправляется, приобретая форму эллипсоида, размеры которого примерно 70×200 мкм.

При наблюдении в световом микроскопе под наружной оболочкой располагается слой, описываемый обычно как зернистая оболочка. Глубже расположен эмбриофор в виде плотной гомогенной пластинки. Изнутри к нему прилегает рыхлый слой, отделенный от онкосферы щелевидным пространством и содержащий ядра. Наружная оболочка яйца *F. fasciolaris* представлена тонкой (14 нм), сильно складчатой электронноплотной мембраной — капсулой (Rybicka, 1972). Внутренняя оболочка представлена гранулярным материалом с нечетким внутренним контуром (рис. 1, 2). Толщина ее варьирует, достигая 2 мкм. Она содержит немногочисленные, преимущественно дегенерирующие органеллы. Снаружи внутренняя оболочка ограничена тонкой мембраной (рис. 1, 2), аналогичной подскорлуповой мембране у других видов, повторяющей в основном очертания капсулы и отделенной от нее щелевидным пространством в 0.1—0.6 мкм.

Под внутренней оболочкой расположен эмбриофор — мощное образование, состоящее из двух слоев: наружного светлого, толщиной 0.16 мкм, сходного по структуре и плотности с материалом внутренней оболочки, и нижележащего осмиофильного тонкогранулярного, толщиной 0.5 мкм. У переднего полюса онкосферы эмбриофор имеет связи с внутренней оболочкой, и последняя в этих локусах содержит материал высокой электронной плотности, не отличающийся от слоя, образующего эмбриофор (рис. 1, 3).

Непосредственно под эмбриофором расположен разреженный тонкогранулярный слой, достигающий наибольшего развития у переднего полюса онкосферы и содержащий здесь дегенерирующие клетки (рис. 1, 2). Толщина его в этих участках достигает 1.7 мкм.

Онкосфера отделена от зародышевых оболочек «мембраной» толщиной 39 нм, образованной радиально расположенными, тесно прилегающими друг к другу электронноплотными элементами палочковидной формы. Снаружи онкосфера покрыта зародышевым тегументом — пластом цитоплазмы, толщина которого широко варьирует (рис. 1, 4). Он расположен на базальной пластинке и достигает наибольшего развития на переднем и заднем полюсах онкосферы. У переднего полюса зародышевый тегумент образует множество складок и лакун вокруг эмбриональных крючьев. Помимо немногочисленных митохондрий, свободных рибосом и микротрубочек в цитоплазме отмечаются включения в виде гранул (рис. 1, 4). Зародышевый тегумент связан с телами некоторых клеток онкосферы цитоплазматическими отростками.

Под базальной пластинкой расположена соматическая мускулатура онкосферы в виде отдельных, толщиной около 0.23 мкм, пучков мышечных волокон большой протяженности (рис. 1, 4, 5). Тяжи мышечных волокон, принадлежащих мускулатуре крючьев, пересекают онкосферу во всех направлениях.

Клеточный состав онкосферы достаточно разнообразен. Здесь имеются клетки с вполне определенными функциями, такие, например, как мышечные, и клетки, функция которых представляется неясной. Последнее относится к железистым образованиям, которые мы, исходя из морфологических различий секреторного продукта, разделяем на три типа.

Наиболее крупной, занимающей значительный объем онкосферы, является железа типа I (рис. 1, 5), описываемая обычно как «железа проникновения». Это многоядерный симпласт подковообразной формы с цитоплазматическими отростками. Ядра овальной формы, размером 1.4×1.7 мкм. Кариоплазма светлая, содержит мелкие скопления хроматина в центре ядра и у внутреннего листка ядерной оболочки. Имеется эксцентрично расположенное плотное ядрышко. Ядерная оболочка обычного строения, с хорошо выраженными порами.

Цитоплазма содержит большое количество свободных рибосом и полисом. Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГЭС) хорошо развита и представлена

крупными полями упорядоченно расположенных длинных узких канальцев. Комплекс Гольджи (*КГ*) слабо выражен в виде нескольких, неправильной формы, пузырьков. Митохондрии овальные или округлые, диаметром до 0.3 мкм, с матриксом умеренной плотности и четкими кристами.

Наряду с клеточными органеллами значительная часть перикариона этих клеток заполнена палочковидными гранулами, размеры которых в среднем составляют 0.11×0.5 мкм. Такой же материал содержат и армированные микротрубочками отростки этих клеток (рис. 1, 6), находящиеся в синцитиальной связи с зародышевым тегументом и являющиеся протоками железы. Следует отметить, что в отличие от онкосфер других видов цестод, у которых протоки «железы проникновения» открываются у зародышевых крючьев (Lethbridge, 1980), для онкосфер *F. fasciolaris* характерно наличие множественных протоков, выявляющихся по всему периметру онкосферы.

Железы типа II представлены парой крупных, грушевидной формы клеток, расположенных в центральной части онкосферы. Ядра овальные, размером 1.8×2.1 мкм. В кариоплазме расположено крупное ядрышко умеренной плотности и мелкие скопления частиц хроматина. В цитоплазме клеток отмечаются многочисленные свободные рибосомы и полисомы. ГЭС хорошо развита и представлена отдельными полями тесно прилегающих друг к другу узких длинных канальцев. Имеется *КГ* в виде нескольких пузырьков неправильной формы. Митохондрии немногочисленны, овальной формы, с матриксом умеренной плотности и тонкими кристами.

В цитоплазме клеток железы типа II располагаются многочисленные гранулы округлой и овальной формы размером от 0.09 до 0.15 мкм. Содержимое гранул различной плотности, мозаичного вида расположено эксцентрично. Такие же гранулы наряду с микротрубочками отмечаются и в отростках, подходящих к поверхности тегумента и образующих так называемые «плотные контакты» с его складками (рис. 2, 1; см. вкл.), в отличие от отростков железы типа I, цитоплазма которых непосредственно переходит в зародышевый тегумент.

По своим характеристикам клетки желез типа II, вероятно, соответствуют «гранулярным» клеткам, описанным ранее для онкосфер *Hymenolepis nana* (Furukawa e. a., 1977), и «соматическим» клеткам онкосфер дилепидид (Gabriel, 1981).

Полигональные клетки с многочисленными отростками, достигающими слоя соматической мускулатуры онкосферы, названы нами «секреторными» клетками или клетками типа III. В перикарионе и отростках этих клеток расположены многочисленные крупные (от 0.14 до 0.25 мкм), сферические включения, заполненные осмиофильным содержимым и имеющие наружную мембрану (рис. 2, 2, 4).

Ядра секреторных клеток овальные, 0.9×1.1 мкм. Кариоплазма содержит хроматин в виде крупных скоплений. В цитоплазме имеется множество свободных рибосом и полисом. ГЭС представлена расположенными перинуклеарно немногочисленными канальцами. *КГ* выражен слабо, как и в клетках предыдущих типов. Митохондрии овальной формы, с тонкими кристами и матриксом умеренной плотности, их размеры колеблются от 0.26 до 0.46 мкм. В отростках клеток имеются микротрубочки.

Тела мышечных клеток расположены под слоем соматической мускулатуры (рис. 2, 3), которая является их производной. Ядра овальные, 1.2×1.3 мкм. Кариоплазма крупнозернистая, имеется небольшое ядрышко и крупные скопления частиц хроматина. Большая часть цитоплазмы заполнена миофибриллами. От перикариона в разные стороны отходят немногочисленные отростки.

В центральной части онкосферы и ближе к заднему полюсу располагаются единичные, вытянутой формы, недифференцированные клетки, вероятно, герминативные (рис. 2, 5). Ядро светлое, с многочисленными скоплениями частиц хроматина. В цитоплазме этих клеток имеются неупорядоченно расположенные многочисленные канальцы ГЭС и большое количество свободных рибосом и полисом. Митохондрии единичные.

С целью определения химической природы содержимого железы типа I была проведена окраска парафиновых срезов альциановым синим-ШИК. Железа демонстрирует бирюзово-голубое окрашивание, что указывает на наличие в ней кислых мукополисахаридов (рис. 2, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Общий план строения яиц *F. fasciolaris* типичен для циклофиллидей. Это 6-крючный зародыш — онкосфера, окруженная несколькими слоями зародышевых оболочек, которые в основном сходны с описанными ранее у онкосфер *Hymenolepis diminuta* (Rybicka, 1972) и у большинства других изученных циклофиллидей (Lethbridge, 1980).

Изучение онкосфер *F. fasciolaris* показало, что с цитоплазмой зародышевого тегумента имеют цитоплазматические связи два типа железистых образований: железа типа I («железа проникновения») и железы типа II. По отношению к железам типа I эти связи в отличие от связей цитонов тегумента цестод на личиночной и взрослой фазе организованы как протоки железистых клеток — они имеют канал, содержащий большое количество упорядоченно расположенных микротрубочек, просвет которого сохраняется даже в отсутствии транспорта секрета. Протоки «железы проникновения» открываются не только в области крючьев, как это характерно для описанных ранее онкосфер, но и по всему периметру онкосферы. Кроме того, для *F. fasciolaris* характерен массивный транспорт секрета в цитоплазму зародышевого тегумента еще до выхода онкосфер из члеников, а не в процессе миграции онкосфер в промежуточном хозяине, как это описано для других видов цестод (Lethbridge, 1980).

Клетки железы типа II имеют меньшее количество цитоплазматических связей с зародышевым тегументом, чем «железа проникновения». В отличие от цитоплазматических отростков последней, непосредственно сообщающихся с цитоплазмой тегумента, отростки клеток железы типа II достигают поверхности зародышевого тегумента, образуя плотные контакты с ним. Сходные наблюдения, судя по иллюстрациям, были сделаны Габрионом (Gabrion, 1984) у онкосфер дилепидид для клеток, названных им «соматическими».

Некоторые исследователи сообщали о наличии двух морфологически различных типах гранул, но предполагали, что это разные состояния одного и того же материала (Collin, 1969; Lethbridge, Gijsberg, 1974). Наши наблюдения позволяют полагать, что эти гранулы продуцируются разными типами клеток. Железы типа I и их протоки содержат осmioфильные палочковидные гранулы, плотность которых может несколько варьировать, что обусловлено разной степенью их зрелости или выделением части их содержимого в матрикс зародышевого тегумента. Клетки желез типа II содержат значительно более мелкие гранулы с содержимым неоднородной плотности. Секрет этих клеток сходен с описанным ранее для «гранулярных» клеток онкосфер *H. nana* (Furukawa e. a., 1977) и для «соматических» клеток онкосфер *Anomotaenia constricta* и *Paricterotaenia porosa* (Gabrion, 1984).

В своем обзоре Летбридж (Lethbridge, 1980) отмечает, что «железы проникновения» большинства циклофиллидей дают ШИК-положительную реакцию, тогда как АС-положительный материал отмечается только у некоторых тениид. Железы типа I («железы проникновения») онкосфер *F. fasciolaris* содержат кислые мукополисахариды. У онкосфер дилепидиды *Paricterotaenia porosa* «железы проникновения» также содержат АС-положительный материал, и это связывается авторами с их функционированием как цистогенных элементов (Краснощевков, Томиловская, 1978). Личинка *F. fasciolaris* относится к циклоцеркам, имеющим, как и моноцерки дилепидид, дополнительную цисту, время формирования которой для данного вида не определено. Возможно, что и железы типа I выполняют роль цистогенных элементов, аналогичную цистогенным железам *P. porosa*.

В онкосферах *F. fasciolaris* отмечена связь отростков клеток желез типа II с зародышевым тегументом посредством образования между ними так называемых «плотных контактов». Это позволяет высказать предположение, с одной стороны, о возможности функциональной связи клеток желез типа II с тегумен-

том, а с другой — о функциональном взаимодействии железистых образований типов I и II (рис. 3).

Кроме того, в онкосферах *F. fasciolaris* выявлен еще один тип клеток, в перикарионе и отростках которых имеются крупные гранулы с осмиофильным содержимым, — «секреторные» клетки или железы типа III. Гранулы этих клеток четко отличаются от секреторных гранул желез типов I и II и по размерам и структуре напоминают нейросекреторные гранулы, описанные у беспозвоночных животных (Barrington, 1979). Наряду с этим отмечена тесная взаимосвязь отростков таких клеток с мышечными волокнами. Эти данные, возможно, могут служить подтверждением высказанного ранее предположения о наличии в онкосферах элементов, осуществляющих регуляцию мышечных сокращений (Collin, 1969; Furukawa e. a., 1977).

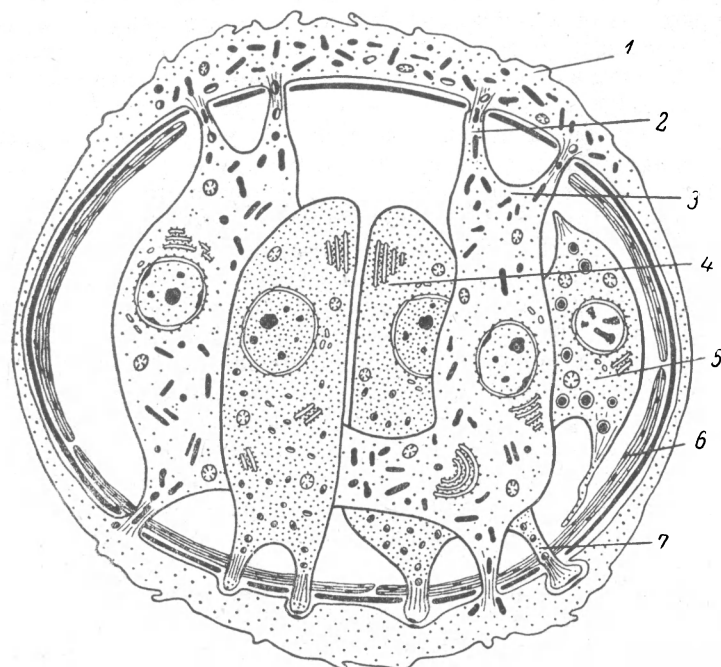


Рис. 3. Схема, отражающая топографию, структуру и связи трех типов железистых образований в онкосфере *F. fasciolaris*.

1 — зародышевый тегумент; 2 — протоки железы типа I; 3 — железа типа I; 4 — железа типа II; 5 — секреторная клетка (тип III); 6 — мышечное волокно; 7 — цитоплазматические отростки железы типа II.

Несмотря на детальное изучение зародышевого тегумента, проведенного на онкосферах *Hymenolepis diminuta* (Rybicka, 1973), вопрос о его генезисе, как мы полагаем, еще недостаточно ясен. Только в двух сообщениях (Rybicka, 1973; Swiderski, Eckert, 1977) отмечалось наличие двуядерной клетки, формирующей, по мнению указанных авторов, зародышевый тегумент онкосферы. Не удалось идентифицировать эту клетку и у изучавшихся нами онкосфер *F. fasciolaris*. В то же время, по нашим данным, подтверждающим сообщение Фурукава с соавторами (Furukawa e. a., 1977), зародышевый тегумент находится в синцитиальной связи с цитоплазмой клеток железы типа I. Возможно, что после завершения функции, эти железы не редуцируются, как другие превентивные элементы, а подвергаются дифференцировке в цитоны тегумента и участвуют в формировании тегумента личинок.

Изучение цитоморфологии онкосфер *F. fasciolaris* показало наличие в них трех типов клеток, содержащих секреторный материал. Поскольку малые размеры исследуемого объекта затрудняют применение точных биохимических методик, а спектр ультрагистохимических методик пока весьма узок и их результаты не всегда стабильны, объяснение функционального значения показанных элементов носит отчасти предположительный характер. Более точная функцио-

нальная трактовка, скорее всего, может быть получена при расширении исследований онкосфер видов цестод, имеющих различную биологию, с применением ставших уже традиционными методов электронной микроскопии и гистохимии.

Л и т е р а т у р а

- Краснощекоев Г. П., Томиловская Н. С. Морфология и развитие цистицеркоидов *Paricterotaenia porosa* (Cestoda: Dilepididae). — Паразитология, 1978, т. 12, вып. 2, с. 108—115.
- Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., Мир, 1969. 645 с.
- Barrington E. J. W. Invertebrate structure and function. Thomas Nelson & Sons Ltd., Sunbury-on-Thames, 1979. 765 p.
- Collin W. K. Electron microscope studies of the muscle and hook systems of hatched oncospheres of *Hymenolepis citelli* McLeod, 1933 (Cestoda: Cyclophyllidae). — J. Parasitol., 1968, vol. 54, N 1, p. 74—88.
- Collin W. K. The cellular organization of hatched oncospheres of *Hymenolepis citelli* (Cestoda, Cyclophyllidae). — J. Parasitol., 1969, vol. 55, N 1, p. 149—166.
- Furukawa T., Miyazato T., Okamoto K., Nakai J. The fine structure of hatched oncospheres of *Hymenolepis nana*. — Jap. J. Parasitol., 1977, vol. 26, N 2, p. 49—62.
- Gabriel Cl. Recherches sur l'oncosphere des cestodes: origine et formation de la calotte recouvrant les crochets. — Z. Parasitenk., 1981, vol. 65, p. 191—205.
- Lethbridge R. S. The biology of oncospheres of cyclophyllidean cestodes (Review article). — Helminth. Abstr., series A, 1980, vol. 49, N 2, p. 60—72.
- Lethbridge R. S., Gijssberg M. F. Penetration gland secretion by hexacanth of *Hymenolepis diminuta*. — Parasitol., 1974, vol. 68, p. 303—311.
- Pence D. B. Electron microscope and histochemical studies of the eggs of *Hymenolepis diminuta*. — J. Parasitol., 1970, vol. 56, N 1, p. 84—97.
- Rybicka K. Ultrastructure of embryonic envelopes and their differentiation in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). — J. Parasitol., 1972, vol. 58, N 5, p. 849—863.
- Rybicka K. Ultrastructure of embryonic syncytial epithelium in a cestode *Hymenolepis diminuta*. — Parasitol., 1973, vol. 66, N 1, p. 9—18.
- Swiderski Z., Eckert J. Electron microscope and histochemical studies on the oncospheres of *Echinococcus granulosus*. — Parasitol., 1977, vol. 75, N 2.

CYTOMORPHOLOGY OF MATURE EGGS OF THE CESTODE FIMBRIARIA FASCIOLARIS (CESTOIDEA, HYMENOLEPIDIDAE)

V. A. Kashin, L. T. Pluzhnikov

SUMMARY

Ultrastructure of mature eggs of the cestode *F. fasciolaris* was studied. Cytomorphological differences have made it possible to determine three types of glandular formations. Cells of type I (glands of penetration) representing a symplast are directly connected by their processes with embryonic tegument, a cytoplasmic layer enveloping oncosphere. Histochemically acid mucopolysaccharides are secretion of these glands. Ending of cell's processes of glands of type II form «dense contacts» with the inner surface of embryonic tegument. Functional interrelation of these types of glandular formations and functional significance of the product secreted by them are discussed.

«Secretory» cells (type III) are first discussed. The connection of their numerous processes with muscular elements has been noted. A regulating effect of these cells on the muscular activity of oncosphere is suggested.

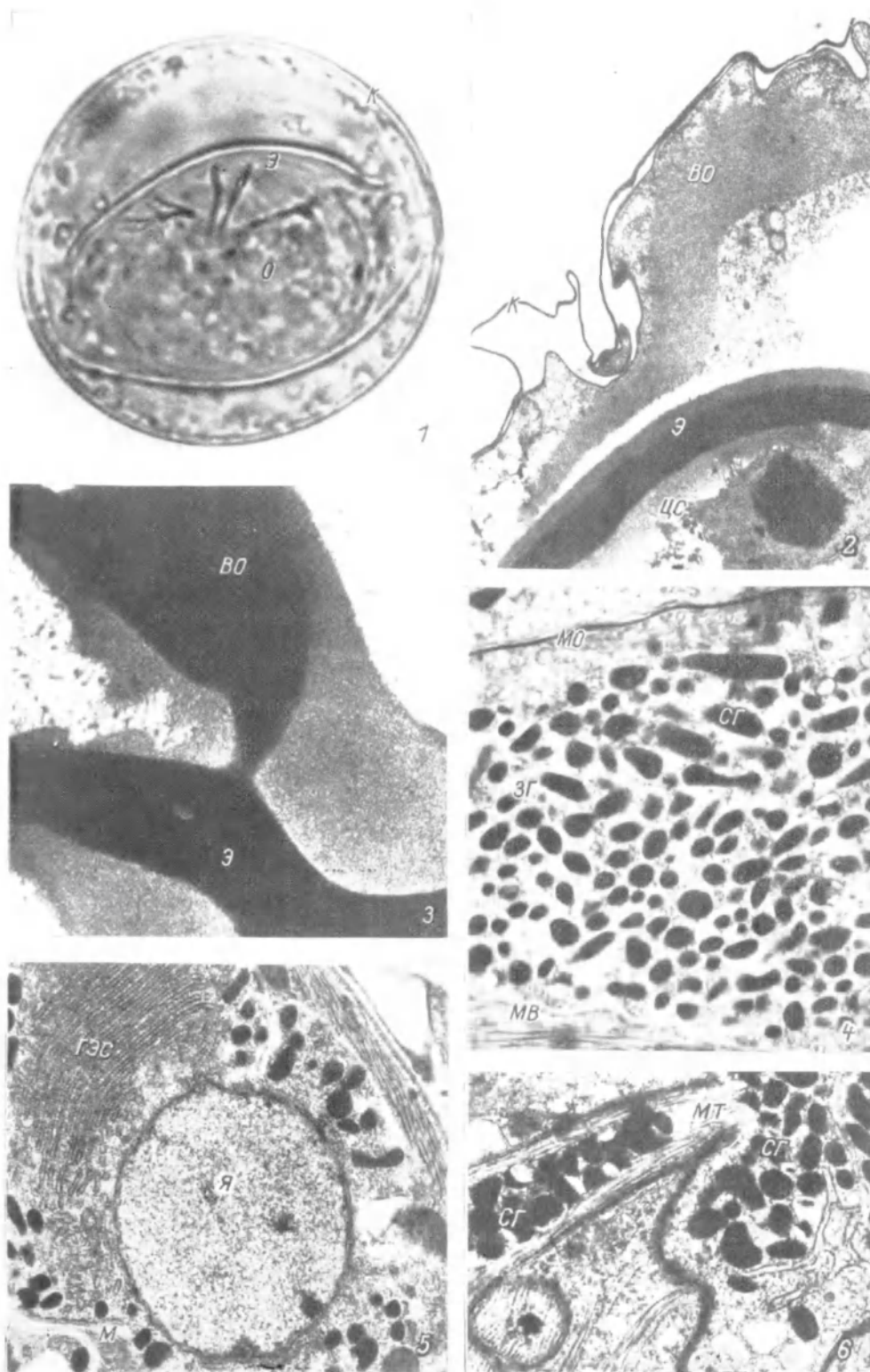


Рис. 1. Строение зрелого яйца цестоды.

1 — общий вид зрелого яйца (ув. 1500); 2 — ультраструктура зародышевых оболочек (ув. 7000); 3 — связь эмбриофора и внутренней оболочки (ув. 20 000); 4 — участок цитоплазмы зародышевого тегумента с гранулами секрета (ув. 15 000); 5 — железа типа I (ув. 16 000); 6 — протоки железы типа I (ув. 18 000). БО — внутренняя оболочка, ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть, ЭТ — зародышевый тегумент, К — капсула, М — митохондрии, МВ — мышечные волокна, МО — «мембрана» онкосферы, МТ — микротрубочки, О — онкосфера, СГ — секреторные гранулы, ЦС — цитоплазматический слой, Э — эмбриофор, Я — ядро.

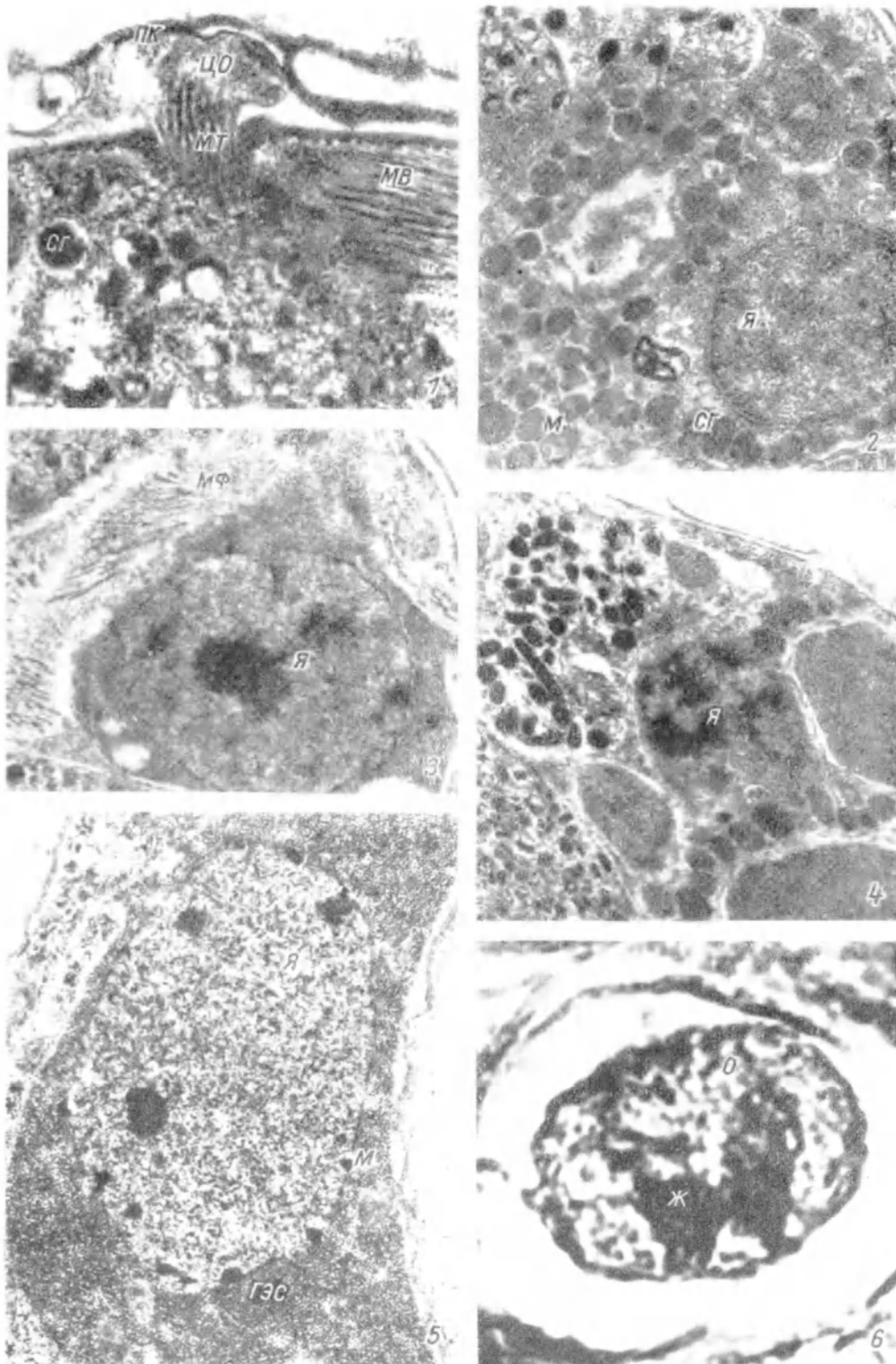


Рис. 2. Строение зрелого яйца цестоды.

1 — контакты цитоплазматических отростков железы типа II с зародышевым тегументом (ув. 32 000); 2 — секреторная клетка (клетка типа III) (ув. 18 000); 3 — мышечная клетка (ув. 20 000); 4 — секреторные гранулы железистых образований трех типов (ув. 13 000); 5 — герминативная клетка (ув. 16 000); 6 — распределение АС-положительного материала в железе типа I (ув. 1300). Ж — железа, МФ — миофибриллы, ПК — плотные контакты, ЦО — цитоплазматические отростки.
Остальные обозначения те же, что на рис. 1.